

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

ULLY STHÉFFANY ROSA SOUZA

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI - *Erysipelothrix sp.* strain 2

**UBERLÂNDIA – MG
2022**

ULLY STHÉFFANY ROSA SOUZA

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI - *Erysipelothrix sp.* STRAIN

2

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca
Co-orientadora: Ms Flávia Alves Martins

UBERLÂNDIA – MG

2022

ULLY STHÉFFANY ROSA SOUZA

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI - *Erysipelothrix sp.* STRAIN

2

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Uberlândia, 08 de agosto de 2022.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Belchiorina Beatriz Fonseca
UFU

Prof^a. Dr^a Eliane Pereira Mendonça
UFU

Dr^a Lara Reis Gomes
LADOC - UFU

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças e ter me carregado até aqui. Ao Senhor toda honra e glória. Nossa Senhora Aparecida, minha mãezinha, por ter sempre guiado os meus passos em direção ao caminho certo.

Aos meus avós, Vanês e Maria Izabel, em meu peito não cabe tamanha gratidão que tenho a vocês, que sempre me apoiaram em tudo, mesmo não concordando com os meus passos seguidos. Vocês são a minha fortaleza, o motivo de todo meu esforço, e essa vitória é mais de vocês que minha. Obrigada por terem criado essa mulher forte e guerreira que nunca desistiu mesmo com todos os percalços e obstáculos. E depois de tantos anos, muito em breve, serei médica veterinária! Ao meu irmão Matheus, que sempre foi meu braço direito cuidando da nossa família, durante todo esse tempo que eu estava longe correndo atrás do meu sonho. Obrigada também meu irmão pela melhor coisa que você pode me dar na vida, meus sobrinhos! Você acertou!

Agradeço a minha mãe, Lidis (*in memoriam*), que mesmo não estando mais entre nós, sempre foi minha maior inspiração. Eu estou realizando o nosso sonho mãe. Tenho certeza que de onde a senhora estiver, você está muito orgulhosa desse sonho realizado. Se não fosse o exemplo de mulher guerreira, forte, corajosa e bondosa que você foi, eu não seria metade do que sou hoje. Sinto sua presença todos os dias me dizendo o que fazer. A você dedico esse momento mãezinha.

Agradeço a minha professora e orientadora Bia, que acreditou mais em mim que eu mesma. Obrigada Bia, por ter me dado a oportunidade de ser sua orientada, de aprender um pouco com você. Os seus ensinamentos vou levar pra vida toda. Nunca me esquecerei de como fui recebida e acolhida por você, com tanto carinho. A todos os outros professores que construíram a veterinária que existe em mim hoje, obrigada por contribuírem com minha formação acadêmica.

Agradeço a todas do LADOC E LABIO, que me ajudaram na realização desse trabalho. Simone que me ajudou a cuidar dos coelhos com tanto amor. A Thais, que durante nossa jornada tivemos o prazer de descobrirmos que erámos primas, obrigada por me ajudar a concluir esse trabalho, sem você me ajudando não teria conseguido.

Agradeço a minha família DACAW, que foram as peças essenciais para eu aguentar todos os surtos da faculdade. A todos vocês, por me ouvirem, por me acolherem, pelas tardes de conversa fiada naquela sala, pela correria na organização de eventos, tudo isso foram degraus na minha construção pessoal e acadêmica. Sem vocês eu não teria conseguido trilhar esse caminho.

Agradeço aos meus amigos que ingressaram nessa jornada comigo, Amanda, que me aturou na comissão de formatura, ao Roger, nosso morde e assopra eterno agita minha vida, Lissa que ainda me aturou por dois anos morando juntas. O nosso cafezinho antes de ir pra aula era o que nos dava força pra enfrentar o dia. E em especial a Maressa, que é metade do meu coração, que sempre me apoiou, que mesmo com todos os percalços foi meu alicerce, você é uma inspiração como mulher e como profissional! Obrigada por ter me socorrido do fundo do poço todas as vezes que precisei, e me levado pra tomar uma cervejinha gelada para acalmar. A todos vocês meus amigos da rançolândia, fizeram meus anos mais felizes.

Agradeço a minha amiga Bárbara Santinelli, quase uma santa por ter morado comigo por 4 anos. Amadurecemos juntas, crescemos juntas, tive o privilegio de ver seu filho nascer, e de ver você se tornando a mulher mais incrível e guerreira dessa geração. Obrigada por cada puxão de orelha, cada conselho, cada festa, cada rolê, cada porre, cada almocinho ruim que você fazia, por ter me levado pra Lavras. Mais que amigas, friends.

Agradeço ao meu amigo Lucas Gayer, que eu nem sei explicar quando viramos amigos, a minha única tristeza foi não ter te conhecido antes. Você é uma pessoa que apesar de querer parecer durão, tem o coração mais lindo do planeta. Obrigada por ser a pessoa com quem eu posso reclamar de tudo, porque você vai estar sempre ali, reclamando junto.

Agradeço a minha amiga Sthéfany, que recentemente tive o prazer de dividir meu lar, mesmo que por pouco tempo. Quantas histórias temos juntas de todos esses anos e saiba que esses últimos três meses dividindo nossa casa e nossa rotina, fechou com chave de ouro esse ciclo da minha vida. Agora minhas portas se abrem após a graduação, e pra você a realização do seu sonho funcionária pública! Obrigada por me ensinar tanto.

Agradeço a todos os meus amigos que fiz durante esses longos anos, sou muito privilegiada por ter conhecido cada um de vocês. Ana Ligia, não tenho palavras

pra agradecer a intensidade da nossa amizade no último ano. Você me acolheu de uma forma que eu nunca serei capaz de agradecer. A sua amizade foi a melhor coisa que me aconteceu. Você é luz, e me iluminou sempre quando eu estava em surto. Obrigada Onze, por me acolher na sua casa quando mais precisei. Obrigada Jéssica e toda sua família, que me adotaram e cuidaram de mim quando minha família estava longe. Obrigada mamacadelenses, em especial ao Ícaro, por terem sido minha segunda casa durante as crises do ano passado. Nunca vou esquecer nenhuma das vezes que dei uma surra em vocês na sinuca. Obrigada a todos que já tomaram um litrão comigo ao som de algum modão, saibam que cada um de vocês tem um lugar especial no meu coração. Levarei cada memória construída com vocês eternamente.

Agradeço a todos os veterinários com os quais eu tive a oportunidade de estagiar durante todos esses anos, vocês me mostraram na prática que eu escolhi a profissão certa. O carinho e dedicação de vocês com os animais me inspira todos os dias a ser uma profissional melhor e mais competente.

“Nunca desista de um sonho só por causa do tempo que você vai levar para realizá-lo. O tempo vai passar de qualquer forma”. A todos vocês que contribuíram um pouco com a minha história e não me deixaram desistir, fica o meu muito obrigada!

RESUMO

Os micro-organismos patogênicos são um dos maiores desafios enfrentados pela avicultura atualmente. O gênero *Erysipelothrix spp* é conhecido atualmente por ser uma zoonose ocupacional, e por causar surtos em animais de produção, inclusive em aves. A descoberta recente de uma nova espécie, *Erysipelothrix sp strain 2*, requer que novos estudos sejam realizados afim de compreendermos melhor sobre sua patogenicidade, diagnóstico, controle e prevenção. O presente trabalho teve como objetivo produzir anticorpos policlonais anti - *Erysipelothrix sp strain. 2*, que poderão ser utilizados posteriormente em outros trabalhos, com fim de conhecer melhor sobre a patogenia, transmissão e tratamento dessa patologia. Para a produção dos anticorpos foram utilizados dois coelhos fêmeas, que ficaram alojados no Laboratório de Ixodologia da Universidade Federal de Uberlândia durante todo o processo de imunização. Foi realizada coleta pré e pós imunização dos dois coelhos para que alíquotas de soro fossem confeccionadas e analisadas. A caracterização e quantificação dos anticorpos foi feita pelo teste ELISA que mostrou que animais imunizados apresentavam altos títulos anti *Erysipelothrix sp strain. 2*. A partir desse trabalho outras pesquisas poderão ser conduzidos para desenvolvimento de testes de diagnóstico e melhor entendimento da relação patógeno hospedeiro de uma espécie ainda pouco estudada.

Palavras-chave: *Erysipelothrix spp*; ELISA; coelhos; diagnóstico.

ABSTRACT

The pathogenic microorganisms are a major defiance faced by the poultry industry today. The *Erysipelothrix spp* genus are known nowadays for being an occupational zoonosis, also for causing outbreaks in farm animals, including the poultry industry. The recent finding of a new species, *Erysipelothrix sp strain 2*, requires further studies to be carried out to comprehend more about its pathogenicity, diagnose, control and prevention. The objective of the present study was to produce polyclonal antibodies anti - *Erysipelothrix sp strain 2*, which may be used in further studies about these bacteria. To obtain the antibodies was used two female rabbits, which was allocated in the ixodology laboratory of Universidade Federal de Uberlândia through the entire procedure of immunization. The collection was performed pre and post immunization of both rabbits so that serum aliquots were prepared and analyzed. The antibodies characterization and quantification were performed using an ELISA test which showed that immunized animals had high anti *Erysipelothrix sp strain 2* titration. From that study, further research may be driven to develop a better diagnose test and better understanding of the host-pathogen relationship of a species that is still poorly studied.

Keywords: *Erysipelothrix spp*; ELISA; rabbits; diagnose.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. Agente Etiológico.....	11
2.2 Patogenia.....	12
2.3 Métodos de diagnóstico.....	13
2.4 Erisipela em aves de produção.....	13
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Produção dos anticorpos.....	16
4.2 Quantificação anticorpos policlonais anti - <i>Erysipelothrix sp. strain 2</i>	17
4.3 Análise estatística.....	18
5 RESULTADOS.....	19
6 DISCUSSÃO.....	22
7 CONCLUSÃO.....	24
REFÊRENCIAS.....	25

1. INTRODUÇÃO

Erysipelothrix rhusiopathiae foi a primeira bactéria do gênero *Erysipelothrix* a ser descrita, e é a causadora de erisipelose em diferentes espécies de animais domésticos e selvagens, entre mamíferos, peixes, aves e invertebrados. Também é um patógeno que infecta humanos, principalmente aqueles cuja ocupação envolve contato direto com animais (VERALDI et al., 2009). Atualmente, se conhecem cinco espécies pertencentes ao gênero *Erysipelothrix*: *E. rhusiopathiae*, com os sorotipos 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21 e N; *E. tonsillarum*, com os sorotipos 3, 7, 10, 14, 20, 22, 23 (TAKESHI et al., 1999); *Erysipelothrix sp. strain 1*, sorotipo 13; *Erysipelothrix sp. strain 2*, sorotipo 18 (BENDER et al., 2010); e a mais recentemente descrita, *Erysipelothrix larvae sp. Nov.* (BANG et al., 2016).

Sua ampla distribuição geográfica e ecológica está relacionada à sua alta capacidade de persistência ambiental, e também à sua capacidade de infectar uma grande quantidade de hospedeiros de vários ecossistemas, inclusive o ser humano (BROOKE; RILEY, 1999). Em suínos, a erisipelose causada pela bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae* pode se manifestar de forma aguda, causando grave septicemia, ou de forma crônica, levando o animal a desenvolver artrite e endocardite (WANG; CHANG; RILEY, 2010). A doença em humanos apresenta forma clínica parecida com a observada em suínos, com erupções cutâneas localizadas, denominadas erisipeloide, ou mesmo lesões cutâneas generalizadas que caminham para sepse e estão frequentemente relacionadas a casos de endocardite (RUIZ et al., 2003).

Surtos da doença causada pela *E. rhusiopathiae* tanto em perus, quanto em suínos, resultam em grandes perdas econômicas na produção. Em suínos, observa-se alta taxa de condenação de carcaça em decorrência das graves lesões, agudas e crônicas (OPRIESSNIG; WOOD, 2012). Em perus acometidos pela doença, não só a alta mortalidade gera prejuízos econômicos, mas também a condenação de carcaça pelas alterações macroscópicas decorrentes da septicemia. Outro fator importante no impacto na produção de perus é a perda de fertilidade nos machos que sofrem da doença (BRICKER; SAIF, 2013).

Quase todos os estudos relacionados a erisipelose são sobre a espécie *E. rhusiopathiae*, existindo poucos estudos sobre a bactéria *Erysipelothrix sp. strain 2*,

descrita recentemente. Sabe-se que ela é virulenta em camundongos infectados em laboratórios, e induz urticária em suínos (TAKAHASHI et al., 1992). *Erysipelothrix sp. strain 2* foi responsável por surtos de erisipela em suínos, e até então não havia relatos da doença em aves. Recentemente, em estudo feito no Brasil coordenado pela orientadora desse TCC, foi descrita como causadora de erisipelose em perus, com alta taxa de morbidade e mortalidade (HOEPERS et al., 2019). Foi isolado por Pomaranski et al. (2020) em peixes ornamentais uma bactéria, até então de gênero desconhecido, causadora de surtos com alta mortalidade em fazendas de aquicultura nos Estados Unidos. Os autores descreveram como sendo do mesmo gênero da *Erysipelothrix rhusiopathiae*, porem como uma espécie nova, e sugeriram o nome de *Erysipelothrix piscisicarius sp.* Em novo estudo publicado por Grazziotin et al (2021), após análises genômicas e investigação da proteína de membrana Spa, foi sugerido que *Erysipelothrix sp. strain 2* que causou surto da doença em perus no Brasil é da mesma genomoespécie identificada por Pomaranski et al. (2020) que causou alta mortalidade nas fazendas de aquicultura.

Por ser uma bactéria recentemente descrita, com poucos estudos relacionando-a ao surto em aves, o presente trabalho objetiva produzir anticorpos policlonais anti-*Erysipelothrix sp. strain 2* em coelhos que poderão ser utilizados em futuros estudos que esclareçam mais sobre sua forma de infecção e patogenia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agente etiológico

Bactérias do gênero *Erysipelothrix*, pertencentes ao filo Firmicutes, são bactérias anaeróbicas facultativas, Gram-positivas, imóveis, não esporuladas, em formato de bastonetes que medem 0,2 a 0,4 µm de diâmetro e 0,8 a 2,5 µm de comprimento (REBOLI; EDMUND; 1989). São capazes de infectar suínos, aves, mamíferos e até mesmo humanos (BROOKE; RILEY 1999). As espécies conhecidas atualmente pertencentes a esse gênero são: *E. rhusiopathiae*, com os sorotipos 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21 e N; *E. tonsillarum*, sorotipos 3, 7, 10, 14, 20, 22, 23 (TAKESHI et al., 1999); Posteriormente, foram descritas mais duas espécies: *Erysipelotrix strain 1*, sorotipo 13; e *Erysipelothrix sp. strain 2*, sorotipo 18 (BENDER et al., 2010). Mais recentemente, foi descrita uma nova espécie pertencente ao gênero, *Erysipelothrix larvae sp. Nov.* (BANG et al., 2016).

A temperatura de crescimento dessa bactéria varia entre 5 e 44°C, com temperatura ideal de 30° a 37°C e um pH 7,2 a 7,6, mas com variações detectadas de 6,8 a 8,2; *E. rhusiopathiae* é catalase e oxidase negativa (REBOLI; EDMUND; 1989). Para haver crescimento bacteriano em laboratório, as bactérias precisam do uso de ágar columbia (AC) ou ágar sangue (AS) enriquecido com sangue de carneiro a 5%. Assim, suas colônias costumam apresentar suas características específicas: colônias claras, circulares, com pequeno diâmetro e podendo ou não ocorrer a formação de alfa hemólise (BROOKE; RILEY, 1999).

Em relação à morfologia da espécie, são descritas duas formas. A primeira é circular, transparente, com colônias pequenas e superfície lisa e brilhante, com possibilidade de realizar beta hemólise, que é conhecida como forma S ou suave. A segunda forma tem colônias maiores e mais planas, com superfície fosca e bordas irregulares, conhecida como forma R ou colônias ásperas. A morfologia das colônias pode variar de acordo com pH e temperatura de crescimento: pH ácido e temperatura por volta de 37°C favorecem o crescimento da forma R; em contrapartida, pH alcalino e temperatura de 30°C favorecem o crescimento da forma S (REBOLI, EDMUND; 1989).

Pouco se sabe sobre a *Erysipelothrix sp. strain 2*, anteriormente classificada como sorotipo 18 da espécie *E. rhusiopathiae*. (TAKAHASHI et al., 1992). Um estudo feito por Takahashi et al. (1992) mostrou que esse sorotipo é altamente virulento para

camundongos, e causa urticárias em suínos. No Brasil, foi relatado um surto em perus machos, causando septicemia e alta mortalidade nos animais. (HOEPERS et al., 2019). Até o presente estudo, a única bactéria do gênero relacionadas a surtos em aves era *E. rhusiopathiae*.

2.2 Patogenia

E. rhusiopathiae possui vários fatores que parecem estar envolvidos em sua patogenicidade. A bactéria produz neuraminidase, enzima com função antifagocitária, que junto com sua capsula aumenta sua resistência à fagocitose. A bactéria também dispõe de diversos receptores da célula hospedeira para aumentar sua sobrevivência intracelular, principal fator relacionado à sua patogenicidade. A produção da enzima hialuronidase parece estar relacionada à patogênese da artrite e trombocitopenia (SHIMOJI, 2000).

O gênero *Erysipelothrix* também possui proteínas imunogênicas que foram definidas como antígeno de proteção de superfície (Spa), e são classificadas em três espécies moleculares: SpaA, SpaB e SpaC. Estas podem ser usadas para distinção das cepas entre as espécies. SpaA é produzido por 11 dos 16 sorotipos de *E. rhusiopathiae*, sendo eles 1a, 1b, 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 17 e N. SpaB, por sua vez, foi identificada nas cepas 4, 6, 11, 19 e 21. O sorotipo 18, atualmente reconhecido como uma nova espécie (*Erysipelothrix sp. strain 2*), foi o único sorotipo a produzir a proteína do tipo SpaC (BENDER et al., 2010).

A erisipelose é considerada uma doença cosmopolita, capaz de infectar uma vasta gama de animais, sejam domésticos, sejam selvagens, inclusive animais marinhos, e também é capaz de infectar o ser humano. Por isso, além de causar enormes prejuízos às produções de suínos e aves, pode ser considerado um grave problema de saúde pública (BRICKER; SAIF, 2013). A infecção humana está relacionada, principalmente, à exposição ocupacional, infectando essencialmente pessoas que trabalham diretamente na área de produção animal, tais como funcionários de frigorífico, pescadores, veterinários açougueiros e funcionários de granjas (VERALDI et al., 2009). A maioria dos casos de infecção em humanos ocorre por via de arranhões ou feridas na pele (TAN et al., 2017). Porém, o acometimento da doença em humanos pode ser subnotificado, pois é uma bactéria com lento crescimento, pequenas colônias, e as lesões podem ser infectadas por patógenos

secundários como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, circunstâncias que levam ao esquecimento deste diagnóstico (BROOKE, 1999).

2.3 Métodos de diagnóstico

O teste de aglutinação com anti-soros específicos, conhecido como sorotipagem, é capaz de reconhecer antígenos de peptidoglicanos que estão presentes na membrana celular da bactéria, portanto, tem valor de diagnóstico para reconhecer bactérias do gênero *Erysipelothrix*.

A PCR, teste de reação em cadeia de polimerase, é uma técnica muito importante no auxílio de detecção das espécies das bactérias do gênero *Erysipelothrix*. Este método de confirmação pode ser empregado de diversas formas. Em um estudo, Ingebritson, Roth e Hauer (2010) usaram *primers* para detectar proteínas de superfície SpaA, SpaB e SpaC, para diferenciação entre as espécies, sendo que os sorovares 1a, 1b, 2, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 16, 17 de *E. rhusiopathiae* expressam a proteína de superfície SpaA, a proteína expressa nos sorovares 4, 5, 11, 19 e 21 é a SpaB, e a proteína SpaC é expressa na espécie *E. sp. strain 2*. Forde e colaboradores (2016) confirmaram, em seu estudo, a espécie *E. sp. strain 2* utilizando *primer* específico para o gene 23 rRNA, técnica também utilizada por outros autores, como Takeshi e colaboradores (1999), que utilizaram 4 pares de *primers* que são capazes de diferenciar quatro espécies do gênero: *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*, *E. sp. Strain 1* e *E. sp. Strain 2*.

Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), é o teste considerado padrão ouro quando se trata de métodos de diagnósticos relacionados a DNA (OLIVE; BEAN, 1999). Essa técnica pode estabelecer um diagnóstico fidedigno com relação a epidemiologia entre as espécies do gênero (WANG; CHANG; RILEY, 2010).

2.4 Erisipela em aves de produção

Perus parecem ser mais gravemente afetados ao serem acometidos pela bactéria *E. rhusiopathiae*, desenvolvendo hemorragias e petéquias na musculatura do peito e da perna, e também apresentando pele cianótica (JANSEN et al., 2015). O primeiro surto de *E. sp. strain 2* em perus, foi descrito por Hoepers et al. (2019). Os animais apresentaram sinais clínicos como fraqueza e aumento da mortalidade. No estudo, também foi avaliada a resistência antimicrobiana das cepas isoladas. As

lesões encontradas no baço, fígado e rins, tinham aspecto friável, sendo sugestivas de septicemia generalizada. Foram isoladas *E. sp. strain 2* de vários órgãos, como baço, fígado, coração, pulmões, rins, traqueia e articulações, sítios comuns de localização de bactérias que causam septicemia em aves (HOEPERS *et al.*, 2019).

Em aves, *E. rhusiopathiae* também causa septicemia, levando a altas mortalidades nos animais. Chirico e colaboradores (2003) isolaram a bactéria do ácaro vermelho hematófago de aves domésticas, *Dermanyssus gallinae*. Este parasita é de difícil controle em aviários, podendo persistir por vários ciclos e causando recorrentes problemas, inclusive por atuar como reservatório de *E. rhusiopathiae*.

Perdas econômicas são significativamente grandes na maioria das espécies acometidas por *E. rhusiopathiae*, devido ao súbito aumento de mortalidade e diminuição da produção de ovos, além de descarte de lotes inteiros infectados, custos com tratamento, desinfecção e limpeza de galpões (BRICKER; SAIF, 2013). Outro fator que parece estar relacionado ao aumento de casos de infecção pela bactéria *E. rhusiopathiae*, causando intensas perdas econômicas, é a mudança do sistema de produção. O sistema amplamente utilizado era o de criação das galinhas poedeiras em gaiolas, e essa forma embora ainda seja o principal tipo de criação, vem diminuindo, devido as novas definições de bem estar animal. Esse sistema está sendo substituído por aves criadas em ambientes internos com uso de cama, ou até mesmo ao ar livre. Com esse novo método de criação as galinhas poedeiras podem passar por novos desafios. Eriksson *et al.* (2014) associou essa mudança do tipo de criação ao aumento de casos de surtos de erisipelose, pois os animais ficam continuamente expostos as fezes que podem acumular na cama, e acredita-se que a principal forma de infecção da doença é pela via oral-fecal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo a produção de anticorpos anti-*Erysipelothrix* sp. strain 2 em coelhos para utilização em estudos posteriores.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir anticorpos policlonais anti-*Erysipelothrix* sp. strain 2.
- Caracterização dos anticorpos policlonais anti-*Erysipelothrix* sp. strain 2 por ELISA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção dos anticorpos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética de uso de animais (CEUA) No do Projeto: N° 009/21D.

Foram utilizados dois coelhos fêmeas de 4 meses de idade com peso aproximado de 2Kg para o protocolo de imunização e obtenção de anticorpos policlonais. Um coelho foi imunizado conforme protocolo para produção de anticorpos anti-*Erysipelothrix sp. strain 2*, e um foi usado como controle negativo. O protocolo definia que seriam realizadas três inoculações com intervalos de 15 dias entre uma e outra, utilizando 100µg de extrato total da bactéria juntamente com 500µg do adjuvante de hidróxido de alumínio. Foram realizadas 3 coletas para avaliação do soro sendo cada qual obtida antes de cada inoculação.

Os animais foram alocados, durante todo o protocolo de imunização, no Laboratório de Ixodologia da Universidade Federal de Uberlândia. Um animal foi imunizado com antígenos brutos de duas cepas de *Erysipelothrix sp. strain 2* utilizando como adjuvante hidróxido de alumínio. A contenção dos animais foi realizada por duas pessoas, uma para imobilizar de forma correta o animal, pegando-o pela pele do pescoço e pelos membros posteriores e segurando-o junto ao corpo, enquanto a outra pessoa foi responsável por inocular o composto (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). As inoculações subcutâneas foram feitas na região do dorso, e a inoculação intramuscular no músculo traseiro da perna. O segundo animal foi utilizado como controle negativo recebendo as inoculações porém sem a presença da bactéria..

Anteriormente à imunização dos animais, alíquotas de soro pré-imune foram retiradas para avaliação da soroconversão. Para tal, foi realizada punção venosa para coleta de 500µL de sangue por meio da veia marginal da orelha. A avaliação do sucesso da imunização foi realizada comparando-se a reatividade e ligação ao antígeno entre o soro pré-imune e após imunização. A primeira inoculação (dia 0) foi utilizado 100µg de extrato total da bactéria e utilizado como adjuvante 500µg de hidróxido de alumínio, por via subcutânea em cinco pontos do dorso dos animais. Após 15 dias, uma nova inoculação foi realizada, nas mesmas quantidades e via subcutânea. A terceira e última inoculação foi realizada após 15 dias da segunda

inoculação (dia 30), com as mesmas quantidades de extrato total e hidróxido de alumínio, porém via intramuscular (SOUZA, 2008).

Também foram realizadas as coletas de sangue dos coelhos por meio da veia marginal da orelha, 15 dias após a segunda inoculação dos antígenos (1-2mL) e 15 dias após a imunização intramuscular pela veia jugular (~10mL), dias 30 e 45, respectivamente. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas para obtenção de soro. Posteriormente à purificação, o *pool* de anticorpos policlonais foi validado e titulado por vários ciclos de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), quanto à sua ligação ao antígeno e melhor concentração a ser utilizado.

4.2 Quantificação anticorpos policlonais anti - *Erysipelothrix sp. strain 2*

A fim de quantificar os anticorpos produzidos neste trabalho, foi realizado um teste de ELISA direto no laboratório de Nanobiotecnologia, localizado no bloco 2E da Universidade Federal de Uberlândia. O teste de Elisa se baseia na identificação de anticorpos ou antígenos marcados com uma enzima, de forma que esta enzima aja sobre um substrato e faça o cromógeno mudar de cor. Os antígenos de *Erysipelothrix sp. strain 2* foram sensibilizados em placas over night a 4°C e passadas as 24h, a placa foi lavada com solução tampão PBS Tween 0,05% uma vez. Após foi feito o bloqueio com caseína (leite desnatado Molico 5% e PBS Tween 0.05%), por uma hora a 37°C, para que todos os sítios livres fossem bloqueados, e após realizada lavagem com a solução tampão PBS Tween 0,05% três vezes. A próxima etapa foi a adição de 50µL de soro produzido do coelho positivo e controle negativo, nas concentrações (1:100), (1:250), (1:500), (1:1000), respectivamente, e incubado por uma hora a 37°C, e nova lavagem com solução tampão PBS Tween 0,05% por seis vezes. Posteriormente a este passo, foi adicionada a cada poço 50µL de anti-coelho HRP – tampão proteico contendo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:10000), e realizada nova incubação por 1 hora a 37°C. A última etapa realizada foi a adição de substrato enzimático OPD mais peróxido de hidrogênio (cromógeno), e a interrupção da reação enzimática foi feita adicionando ácido sulfúrico. Foram realizadas duas repetições em quatro diluições diferentes do anticorpo, (1:100), (1:250), (1:500), (1:1000), respectivamente, suficientes para adsorver nos poços da placa. A leitura do teste se deu conforme a mudança de cor devido a atividade enzimática, e sua

intensidade é relativa à quantidade de anticorpos e antígenos ligados, e foi mensurado usando espectrofotômetro (leitora de placas) (MINEO et al., 2016).

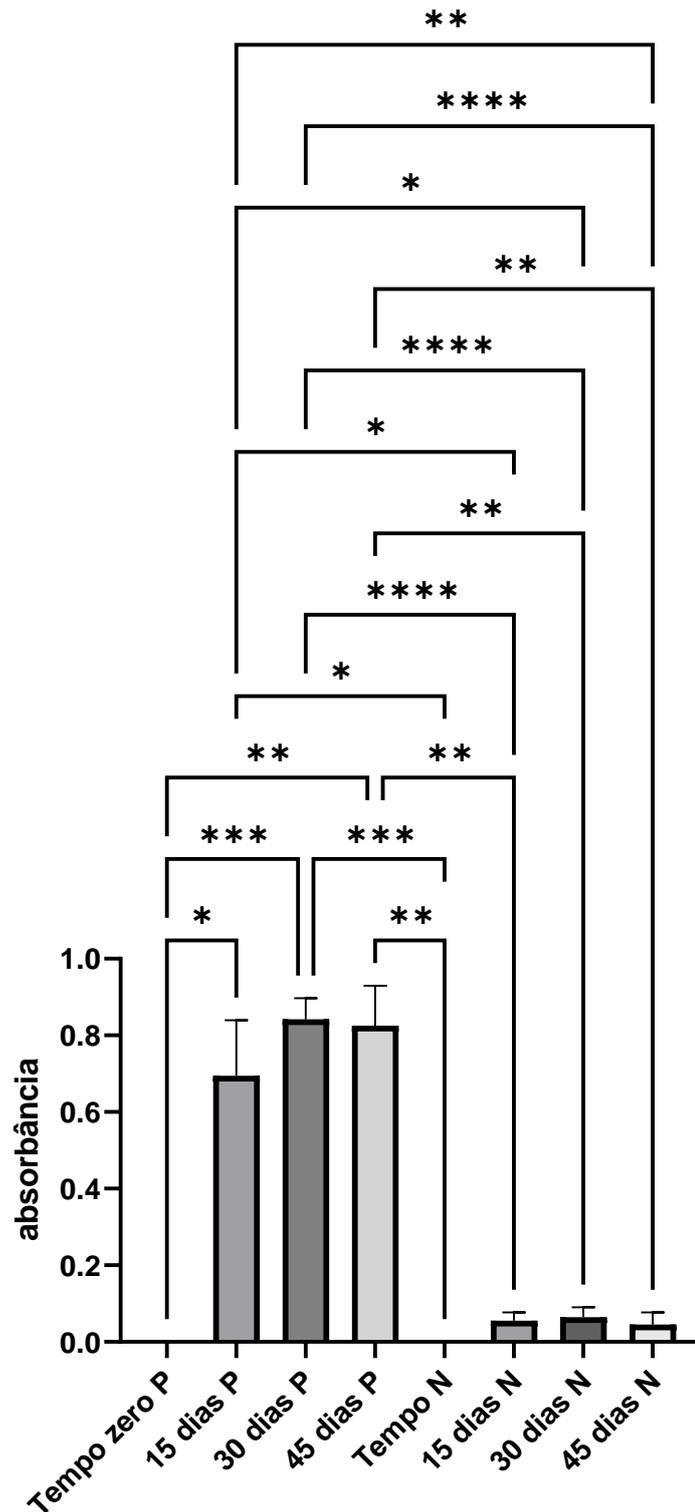
4.3 Análise estatística

Para análise da efetividade da imunização, os valores obtidos em ensaio de ELISA (valores de absorvância) foram analisados por estatística pareada pelo teste da análise da variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey considerando um nível de significância de 0,05. O programa Graph Pad Prism 9.2 foi usado para fazer as análises.

5 RESULTADOS

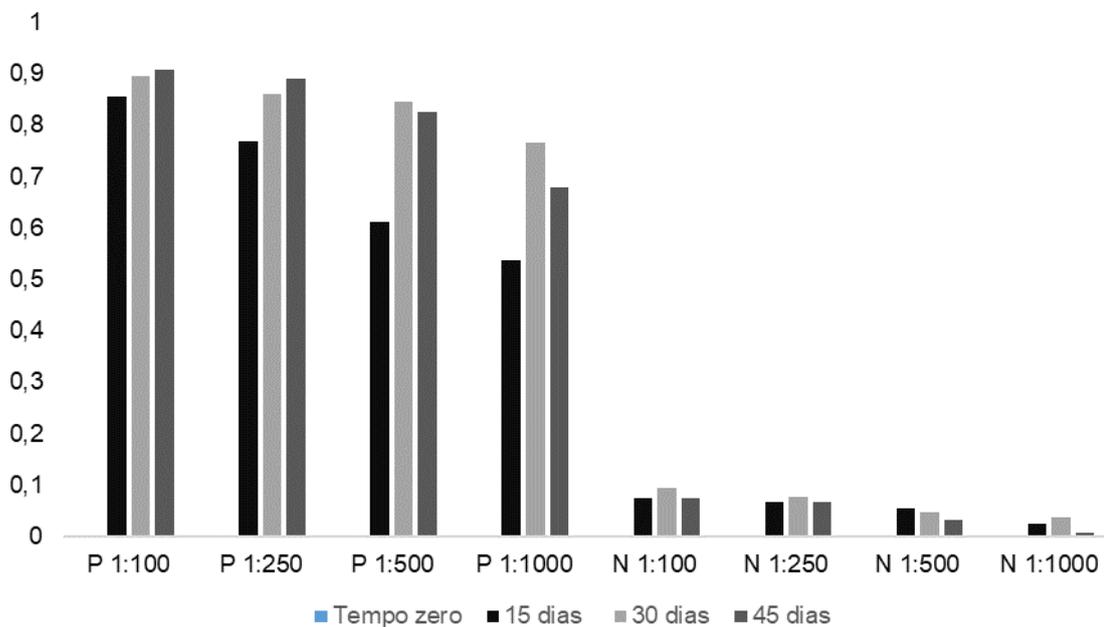
A titulação de anticorpos se mostrou com valores maiores no coelho inoculado com o extrato total de *Erysipelothrix sp.* strain 2 desde a primeira inoculação (Figura 1). Não houve um aumento de títulos entre a primeira e a última coleta pós inoculação (Figura 1). A figura 2 mostra a média das absorbância avaliando cada diluição. Analizando o gráfico de forma qualitativa, como esperado, há uma diminuição dos títulos a medida que aumenta a diluição dos soros.

Figura 1. Resultados do teste de ELISA (medidos por absorbância) dos anticorpos policlonais anti - *erysipelo*thrix produzidos durante esse experimento.



Foram realizadas quatro diluições e em duplicata, para cada soro produzido do coelho inoculado com antígeno (P) e do coelho controle negativo (N).

Figura 2. Resultados do teste de ELISA dos anticorpos policlonais anti - *erysipelo*thrix produzidos durante esse experimento em animais imunizados (P) e não imunizados (N).



Foram realizadas quatro diluições e em duplicata para grupo. Para análise foi usada estatística pareada usando as diferentes diluições pelo teste de anova ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). The symbols represent: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p < 0,0001$.
 Fonte: Autoria própria, 2022.

6 DISCUSSÃO

Até a data do presente trabalho, pouco se sabe sobre a espécie *Erysipelothrix sp.* strain 2. No Brasil, ela foi isolada pela primeira vez em um surto de perus em uma indústria no Triângulo Mineiro. Até onde sabemos, esse é o primeiro trabalho a produzir anticorpo anti *Erysipelothrix sp.* strain 2. Diferente do esperado, não houve diferença dos títulos (medidos em absorbância) para a primeira coleta após a inoculação e a última. Isso não é esperado já que após as reimunizações há aumento dos títulos de anticorpos. Nesse trabalho nós não quantificamos o anticorpo e apenas avaliamos a absorbância o que nos dá um valor relativo. Dessa forma para quantificar a quantidade exata de anticorpo produzida é necessário fazer testes construindo a curva padrão relativa a partir da quantificação de um controle conhecido e essa pode nos apresentar um resultado mais claro dos títulos após as diferentes imunizações.

A imunização do coelho com antígeno *Erysipelothrix sp.* strain 2 levou a produção de anticorpos capazes de reagir ao antígeno no imunoensaio realizado neste trabalho, em todas as diluições utilizadas (Figura 2). Conforme esperado em diluições menores do soro houve maiores títulos. No entanto mesmo na diluição 1:1000 os títulos foram muito superiores aos controles negativos e assim essa diluição se torna adequada para futuras análises.

Os anticorpos produzidos são amplamente utilizados para fins de diagnósticos e marcação da espécie que facilita as análises epidemiológicas, clínicas e a relação patógeno hospedeiro.

Giménez-Lirola, Xiao, Halbur e Opriessnig (2012) realizaram um estudo com *Erysipelothrix rhusiopathiae*, no qual foram coletadas amostras de soro de suínos vacinados contra erisipela e também de suínos infectados experimentalmente com a bactéria, e desenvolveram um ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti- *Erysipelothrix spp.* Os dados encontrados neste trabalho sugerem a importância do ELISA na detecção de anticorpos anti-IgG contra diferentes sorotipos de *Erysipelothrix spp.*

Chirico (2009) realizou um estudo para avaliação da transmissão *Erysipelothrix rhusiopathiae* pelo ácaro *Dermanyssus gallinae*, que atualmente é reconhecido como um importante vetor na transmissão da bactéria para aves na cadeia de produção. Os resultados do ELISA desenvolvidos no referido trabalho mostram que de 3 a 5 dias as

aves inoculadas já haviam desenvolvidos anticorpos anti - *Erysipelothrix spp*, e com 10 dias já haviam se recuperado da doença.

Os anticorpos produzidos ainda poderão ser utilizados em inúmeros ensaios, tais como imunofluorescência, Western blot, imuno-histoquímica, imunofluorescência e outros. Com esses testes, será possível realizar o estudo de proteínas bacterianas envolvidas na patogenicidade e estímulo da resposta imunológica. Provavelmente esse é o primeiro anticorpo produzido para esse patógeno que parece ser uma espécie ainda subnotificada.

Ensaio como este realizados neste trabalho são de suma importância para compreensão da resposta imunológica dos animais frente ao desafio e exposição do patógeno, além de ser primordial para análises mais detalhadas sobre a patogenicidade da bactéria *Erysipelothrix sp. strain 2*, que ainda é pouco estudada. Os anticorpos produzidos poderão ser utilizados em diversos estudos posteriores afim de se conhecer melhor os mecanismos da bactéria.

7 CONCLUSÃO

A partir desse trabalho foi possível obter anticorpos de *Erysipelothrix sp.* strain 2 de forma relativamente rápida e prática, e esses antissoros obtidos poderão ser usados para inúmeros outros trabalhos a respeito desse agente etiológico tão pouco conhecido, trabalhos estes que podem esclarecer melhor sobre a patogenia, além de testes de diagnóstico, e ainda possíveis tratamentos para casos de surtos de erisipelose causados por esta bactéria.

REFÊRENCIAS

- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (orgs). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.
- BANG, B. H.; RHEE, M. S.; CHANG, D. H.; PARK, D. S.; KIM, B. C. Erratum to: *Erysipelothrix larvae* sp. nov., isolated from the larval gut of the rhinoceros beetle, *Trypoxylus dichotomus* (Coleoptera). **Antonie van Leeuwenhoek**, v.109, n.1, p.167-168, 2016.
- BENDER, J. S.; SHEN, H. G.; IRWIN, C.K.; SCHWARTZ, K. J.; OPRIESSNIG, T. Characterization of *Erysipelothrix* Species Isolates from Clinically Affected Pigs, Environmental Samples and Vaccine Strains from Six Recent Swine Erysipelas Outbreaks in the United States. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n.10, p.1605-1611, 2010.
- BRICKER, J. M.; SAIF, M. Y. Erysipelas, in: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J.R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SUAREZ, L. D.; NAIR, V. (eds.), **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State University Press, p.812-826, 2013.
- BROOKE, J. C.; RILEY, T. V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. **J. Med. Microbiol.**, v.48, n.20, p.789-799, 1999.
- CHIRICO, J.; ERIKSSON, H.; FOSSUM, O.; JANSSON, D.. The poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, a potential vector of *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing erysipelas in hens. **Medical And Veterinary Entomology**, v.17, n.2, p.232-234, 2003.
- ERIKSSON, H.; BAGGE, E.; BAVERUD, V.; FELLSTRÖM, C.; JANSSON, D.S. *Erysipelothrix rhusiopathiae* contamination in the poultry house environment during erysipelas outbreaks in organic laying hen flocks. **Avian Pathology**, v.43, n. 3, p.231-237, 2014.
- FORDE, Taya L.; RATHEESH, Nichith Kollanandi; HARVEY, William T.; THOMSON, Jill R.; WILLIAMSON, Susanna; BIEK, Roman; OPRIESSNIG, Tanja. Genomic and Immunogenic Protein Diversity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Isolated From Pigs in Great Britain: implications for vaccine protection. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1-16, 13 mar. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00418>.
- GRAZZIOTIN, A. L.; VIDAL, N. M.; HOEPERS, P. G.; REIS, T. F. M.; MESA, D.; CARON, L. F.; INGBERMAN, M.; BEIRÃO, B. C. B.; ZUFFO, J. P.; FONSECA, B. B. Comparative genomics of a novel clade shed light on the evolution of the genus *Erysipelothrix* and characterise an emerging species. **Scientific Reports**, [S.L.], v.11, n.1, p.11-24, 9 fev. 2021.
- GIMÉNEZ-LIROLA, L. G.; XIAO, C. T.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on a recombinant SpaA protein (rSpaA415) for detection of anti-*Erysipelothrix* spp. IgG

antibodies in pigs. **Journal Of Microbiological Methods**, [S.L.], v.91, n.1, p.191-197, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.06.011>.

HOEPERS, P. G.; REIS, T. F. M.; MENDONÇA, E. P.; ROSSI, D. A.; KOERICH, P. K.; FRANÇA, T. V. J.; ZUFFO, J. P.; V. JUNIOR, E. C.; FONSECA, B. B.. First outbreak reported caused by *Erysipelothrix* species strain 2 in turkeys from poultry-producing farms in Brazil. **Annals Of Microbiology**, v.69, n.11, p.1211-1215, 2019.

INGEBRITSON, A. L.; ROTH, J. A.; HAUER, P. J. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: association of Spa-type with serotype and role in protective immunity. **Vaccine.**, v.28, p.2490-2496, 2010.

JANSEN, T.; VOSS, M.; KÜHL, M.; SEMMLER, T.; PHILLIP, H. C.; EWERS, C. A combinational approach of multilocus sequence typing and other molecular typing methods in unravelling the epidemiology of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains from poultry and mammals. **Veterinary Research**, v.46, n.1, p.46-84, 2015.

MINEO, J. R.; SILVA, M. C.; BRIGIDO, P. C.; PENHA, H. M. C. A. **MANUAL ILUSTRADO DE PRATICAS LABORATORIAIS EM IMUNOLOGIA**. Uberlandia: Edufu, 2016.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.** V.37, p.1661–1669, 1999.

OPRIESSNIG, T.; WOOD, R. L. Erysipelas. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G.W. (eds.) **Diseases of swine**. Hoboken: John Wiley & Sons; 2012. pp.750–759.

POMARANSKI, Eric K.; GRIFFIN, Matt J.; CAMUS, Alvin C.; ARMWOOD, Abigail R.; SHELLEY, Johnny; WALDBIESER, Geoffrey C.; LAFRENTZ, Benjamin R.; GARCÍA, Julio C.; YANONG, Roy; SOTO, Esteban. Description of *Erysipelothrix piscisicarius* sp. nov., an emergent fish pathogen, and assessment of virulence using a tiger barb (*Puntigrus tetrazona*) infection model. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 70, n. 2, p. 857-867, 1 fev. 2020. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003838>.

REBOLI, A. C.; EDMUND, F. W. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an occupational pathogen. **Clin Microbiol Rev**, v.2, n.1, p.354-359, 1989.

RUIZ, M. E.; RICHARDS, J. S.; KERR, G. S.; KAN, V. L. *Erysipelothrix rhusiopathiae* septic arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v.48, n.4, p.1156-1157, 2003.

SHIMOJI, Y. Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. **Microbes And Infection**, v.2, n.8, p. 965-972, 2000.

SOUZA, C. M. **Produção de anticorpos IgY de galinhas e IgG de coelhos para análise da auxina e citocininas**. 2008. 61f. Tese (Doutorado) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Seropédica, 2008.

TAKAHASHI, T.; FUJISAWA, T.; TAMURA, Y.; SUZUKI, S.; MURAMATSU, M.; SAWADA, T.; BENNO, Y.; MITSUOKA, T. DNA relatedness among *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains representing all twenty-three serovars and *Erysipelothrix tonsillarum*. **Int J Syst Bacteriol.**, v.142, n.3, p.469-476, 1992.

TAKESHI, K.; MAKINO, S.; IKEDA, T.; TAKADA, N.; NAKASHIRO, A.; NAKANISHI, K.; OGUMA, K.; KATOH, Y.; SUNAGAWA, H.; OHYAMA, T. Direct and rapid detection by PCR of *Erysipelothrix* sp. DNAs prepared from bacterial strains and animal tissues. **J Clin Microbiol.**, v.37, n.12, p.4093-4098, 1999.

TAN, E. M.; MARCELIN, J. R.; ADEEL, N.; LEWIS, R. J.; ENZLER, M. J.; TOSH, P. K.. *Erysipelothrix rhusiopathiae* bloodstream infection - A 22-year experience at Mayo Clinic, Minnesota. **Zoonoses And Public Health**, [S.L.], v. 64, n. 7, p. 65-72, 16 fev. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/zph.12348>.

VERALDI, S.; GIRGENTTI, V.; DASSONI, F.; GIANOTTI, R. Erysipeloid: a review. **Clinical And Experimental Dermatology**, v.34, n.8, p.859-862, 2009.

WANG, Q.; CHANG, B. J.; RILEY, T. V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p.405-417, 2010.